

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620131152480

UDC_____

廈門大學

硕士学位论文

原油和铅诱导斑马鱼autism-like行为缺陷
及机制的初步研究

Exposure to the water soluble fraction of crude oil
and lead induces autism-like behavioral deficits and
mechanism involved in zebrafish (*Danio rerio*)

王元川

指导教师姓名: 王重刚 教授

专业名称: 动物学

论文提交日期: 2015 年 4 月

论文答辩时间: 2015 年 5 月

学位授予日期: 2015 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2016 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

☐ 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

☐ 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

目 录	I
CONTENTS	III
摘要	V
Abstract	VII
第一章 前言	1
1.1 自闭症	1
1.1.1 自闭症的特征与发展状况	1
1.1.2 自闭症的病因学研究	3
1.2 环境污染现状及危害	6
1.2.1 重金属铅污染现状及危害	6
1.2.2 原油的污染现状及危害	7
1.3 模式生物斑马鱼	9
1.3.1 斑马鱼的生物学特征	9
1.3.2 斑马鱼在自闭症研究中的应用	11
1.4 本研究的内容和目的	12
第二章 材料与方法	13
2.1 实验仪器和设备	13
2.2 实验主要试剂	14
2.3 实验动物的饲养与暴露	15
2.4 基因表达分析	16
2.4.1 组织总 RNA 的提取	16
2.4.2 1st cDNA 合成	17
2.4.3 切胶回收	17
2.4.4 实时荧光定量 PCR	18
2.5 Western Bolt	20
2.6 组织匀浆	21
2.7 五羟色胺 (5-HT) 和皮质醇浓度的测定	21
2.8 Ca^{2+} -ATPase、 $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase 和 总 ATPase 活性的测定	21
2.9 WSF 和 Pb 实际浓度的测定	21
2.10 基因网络图预测	22

2.11 行为学测试.....	22
2.12 数据处理	23
第三章 实验结果	24
3.1.成年雌性斑马鱼暴露引起的子代毒性效应	24
3.1.1 WSF 和 Pb 在水体中的浓度.....	24
3.1.2 成年雌性斑马鱼暴露于 WSF 和 Pb 对子代行为的影响	24
3.1.3 幼鱼组织中五羟色胺和皮质醇的浓度	29
3.1.4 幼鱼组织中总 ATPase、Ca ²⁺ -ATPase、Na ⁺ /K ⁺ -ATPase 活性水平	29
3.1.5 基因表达变化和基因网络图的预测	30
3.2 母体和胚胎连续暴露引起的子代毒性效应	33
3.2.1 母体和胚胎连续暴露于 WSF 和 Pb 对子代行为的影响	33
3.2.2 15dpf 斑马鱼幼鱼的运动轨迹.....	37
3.2.3 母体和胚胎连续暴露于 WSF 和 Pb 对基因的影响	37
3.2.4 母体和胚胎连续暴露于 WSF 和 Pb 对部分蛋白的影响	42
3.4.5 母体和胚胎连续暴露于 WSF 和 Pb 对钙离子通道与 Ras/Raf/Erk1/2 分子信号通路的影响.....	43
第四章 讨论.....	46
4.1 斑马鱼母体暴露于 WSF 和 Pb 对子代的毒性效应	46
4.2 母体和胚胎连续暴露于 WSF 和 Pb 对子代的毒性效应	51
第五章 总结与展望.....	57
5.1 总结	57
5.2 展望	57
参考文献.....	59
致 谢	71

CONTENTS

CONTENTS (In Chinese)	I
CONTENTS (In English)	III
Abstract (In Chinese)	V
Abstract (In English)	VII
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Autism spectrum disorder	1
1.1.1 The characterize and developmental status of autism spectrum disorder	1
1.1.2 The etiology study of autism spectrum disorder	3
1.2 Current status of environmental pollution and its damage	6
1.2.1 The current status of lead pollution and its damage	6
1.2.2 The current status of crude oil pollution and its damage	7
1.3 Model organism zebrafish	9
1.3.1 Biological characteristics of zebrafish	9
1.3.2 Application of zebrafish in autism spectrum disorder research	11
1.4 Research contents and objectives	12
Chapter 2 Materials and methods	13
2.1 Experiment instruments and equipments	13
2.2 Main reagents	14
2.3 Animals and exposure experiment	15
2.4 The analysis of gene expression	16
2.4.1 Total RNA extraction	16
2.4.2 1st strand cDNA synthesis	17
2.4.3 Gel extraction	17
2.4.4 Real time quantitative PCR	18
2.5 Western Bolt	20
2.6 Tissue homogenates	21
2.7 Serotonin and cortisol assay	21
2.8 Ca^{2+}-ATPase、$\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$-ATPase and total ATPase assay	21
2.9 WSF and Pb actual concentrations in exposure water	21
2.10 Predicted gene network	22
2.11 Behavior test	22
2.12 Statistical analysis	23
Chapter 3 Results	24
3.1. The toxicity effect of adult female zebrafish exposure to WSF and Pb on larvae	24
3.1.1 WSF and Pb concentrations	24

3.1.2 Effect of adult female zebrafish exposure to WSF and Pb on larvae behavior	24
3.1.3 The concentration of serotonin and cortisol in whole-body	29
3.1.4 The levels of total ATPase、Ca ²⁺ -ATPase、Na ⁺ /K ⁺ -ATPase of larvae tissue	29
3.1.5 The change expression of gene and predicted gene network	30
3.2 The toxicity effect of maternal&embryo succession exposure on larvae	33
3.2.1 Effect of maternal & embryo succession exposure to WSF and Pb on larvae behavior.....	33
3.2.2 Movement track of 15dpf larvae	37
3.2.3 Effect of maternal & embryo succession exposure to WSF and Pb on gene.....	37
3.2.4 Effect of maternal&embryo succession exposure to WSF and Pb on partly protein	42
3.4.5 Effect of maternal & embryo succession exposure to WSF and Pb on calcium channels and Ras/Raf/Erk1/2 signaling pathway	43
Chapter 4 Discussion	46
4.1 The toxicity effect of maternal exposure to WSF and Pb on larvae	46
4.2 The toxicity effect of maternal&embryo zebrafish succession exposure on larvae.....	51
Chapter 5 Conclusions and perspectives	57
5.1 Conclusions	57
5.2 Perspectives	57
References	59
Acknowledgement	71

摘要

自闭症 (Autism spectrum disorder, ASD) 是一种伴有复杂行为症状的神经发育紊乱疾病, 其致病机理由多因素组成, 发病率逐年增加。ASD 的三大主要特征是语言沟通障碍、社会关系障碍、兴趣狭窄和刻板重复性动作。尽管 ASD 的致病机理仍不清楚, 病因学被广泛认为可能涉及到复杂的多基因交互作用和环境因素。

本研究中, 我们使用斑马鱼作为模式生物探讨雌性斑马鱼母体暴露于原油的水溶性成份 (Water soluble fraction of crude oil, WSF)、铅 (Lead, Pb) 和它们的混合物 (WSF+Pb) 中能否诱导出子代幼鱼类似自闭症的行为, 浓度分别为 WSF (5 $\mu\text{g/L}$)、Pb (20 $\mu\text{g/L}$) 和 WSF+Pb (5+20 $\mu\text{g/L}$)。结果表明, 母体单独和联合暴露于 WSF 和 Pb 中改变了斑马鱼的游泳行为模式, WSF 暴露显著增加了子代幼鱼焦虑和自发活动, 降低了重复刻板行为和五羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 水平。然而, 联合暴露于 WSF+Pb 降低了行为活力和社群性行为, 增加了转圈行为和边缘趋向性。调控环境因子诱导类似自闭症行为的多个潜在关键基因表达水平被发现具有显著性改变。WSF 和 Pb 干扰 ASD 的基因调控网络被建立, 这为进一步研究 WSF 和 Pb 调控 ASD 分子过程提供了线索。上述结果表明, 母体 WSF 和 Pb 单独或联合暴露能诱导子代斑马鱼产生类似自闭症行为。

基于胚胎期是鱼类发育的敏感时期, 我们深入探讨了斑马鱼母体和胚胎连续暴露于 WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$)、Pb (10, 100 $\mu\text{g/L}$) 和 WSF+Pb (5+10 $\mu\text{g/L}$) 是否存在剂量效应和能否诱导出子代幼鱼类似自闭症的行为。在连续暴露实验中, 15 dpf (days post fertilization) 和 30 dpf 的子代斑马鱼在 WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$) 和 Pb (10 $\mu\text{g/L}$) 暴露条件下均表现出游泳活力改变; 15 dpf 幼鱼在 WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$) 和 Pb (10, 100 $\mu\text{g/L}$) 暴露条件下表现出焦虑增加, WSF (5 $\mu\text{g/L}$) 和 Pb (10 $\mu\text{g/L}$) 暴露对社群性活动产生的效应相反; 然而, 30 dpf 的子代斑马鱼在 WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$)

和 Pb (10, 100 $\mu\text{g/L}$) 暴露条件下均表现出社群性行为减少, Ca^{2+} 通路受到干扰发生失衡, 参与 Ras/Raf/Erk1/2 信号通路的分子表达受到抑制。

关键词: 自闭症; 斑马鱼; 原油的水溶性成份; 铅; 行为

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Autism spectrum disorder (ASD) is a neuro-development disorder with complex behaviorally symptoms and multi-factorial pathogenesis, increasing reported prevalence worldwide. ASD is characterized by pervasive impairments in social interactions, deficits in verbal and nonverbal communication, interests and stereotype, repetitive patterns of behaviors. Although the pathogenesis of ASD remains unclear, etiology is thought to involve complex, multigenic interactions and possible environmental contributions.

In the present study, we used zebrafish (*Danio rerio*) as a model to investigate whether female zebrafish maternal exposure to the water soluble fraction of crude oil (WSF), lead (Pb) and their mixture (WSF+Pb) could induce autism-like behavior in larvae, concentrations are WSF (5 $\mu\text{g/L}$), Pb (20 $\mu\text{g/L}$) and WSF+Pb (5+20 $\mu\text{g/L}$), respectively. Our results showed that isolated and combined WSF/Pb exposure altered the behavioral pattern of fish swimming. WSF significantly increased anxiety and locomotor activity, decreased repetitive behavior, and reduced the level of serotonin. However, co-exposure to WSF/Pb decreased behavioral activity and shoaling behavior, and increased cycle swimming and edge preference. Significant changes in the expression level of the multiple genes potentially critical for regulating environmental factor induced autism-like behavior were found. A gene network regulating ASD disturbed by WSF/Pb exposure was established, providing a clue for further mechanistic studies explaining molecular events regulating WSF/Pb mediated ASD. Taken together, our results indicated that maternal isolated or co-exposure to WSF/Pb could induce autism-like behavior in larvae.

Embryo stage was the sensitive development period of fish. In order to further investigate whether maternal & embryo succession exposure to WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$), Pb

(10, 100 $\mu\text{g/L}$) and their mixture WSF+Pb (5+10 $\mu\text{g/L}$) existed a dose-dependent response and could induce autism-like behavior in larvae. In succession exposure experiment, exposure to WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$) and Pb (10 $\mu\text{g/L}$) altered the behavioral pattern of 15dpf (days post fertilization) and 30 dpf zebrafish swimming. exposure to (5, 50 $\mu\text{g/L}$) and Pb (10, 100 $\mu\text{g/L}$) increased anxiety of 15 dpf zebrafish larvae, there was an opposite effect on shoaling behavior; However, exposure to WSF (5, 50 $\mu\text{g/L}$) and Pb (10, 100 $\mu\text{g/L}$) decreased shoaling behavior in 30dpf zebrafish, calcium channels was disturbed and imbalance, molecular were inhibited of Ras/Raf/Erk1/2 signaling pathway.

Keywords: Autism spectrum disorder; *Danio rerio*; Water soluble fraction of crude oil; Lead; Behavior

第一章 前言

1.1 自闭症

1.1.1 自闭症的特征与发展状况

儿童自闭症 (Autism spectrum disorder, ASD), 又称孤独症或孤独症谱群疾病, 是一种严重的广泛性神经发育障碍性疾病, 存在脑发育异常。近年来在世界范围内发病率逐渐上升, 大约为 1/88, 常发病于三岁前, 男性和女性的发病率比例约为 4:1^[1, 2]。根据临床症状轻重程度, 主要分为自闭症及不典型自闭症, 包括阿斯伯格综合症 (Asperger syndrome)、边缘自闭症和类似自闭症, 其中 ASD 临床症状最为严重^[3]。和 ASD 症状高度相似的疾病还有脆性 X 综合征 (Fragile X syndrome)、结节性硬化综合症 (Tuberous sclerosis syndrome)、天使人综合症 (Angelman syndrome)、提摩西综合症 (Timothy syndrome)、瑞氏综合征 (Rett syndrome) 和精神分裂症^[4]。ASD 儿童的三大主要特征是语言沟通障碍、社会关系障碍、兴趣狭窄和刻板重复性动作^[5, 6]; 临床中, ASD 患者表现出频繁焦虑^[5], 影响学习能力^[7]。ASD 的诊断主要是通过历史行为表现和当前行为评估确定的, 而不是神经病理学标志物^[8]。ASD 的诊断标准见表 1-1, 其核心临床特征和相关症状见图 1-1。

ASD 的影响因子尚不清楚, 可能的病因被认为主要是以下两个方面: 遗传和环境。ASD 表现出高遗传性 (~90%)^[9], 有研究明确指出 ASD 是主要与遗传因素相关的疾病^[4]。同时, 至少有三个致癌物似乎是 ASD 的高危因子: 萨利多胺、丙戊酸 (Valproic acid, VPA) 和乙醇^[10]。目前许多人认为可能是基因和环境的共同作用产生了 ASD, 但其病理原因至今仍不清楚^[11, 12]。来自家庭调查和遗传学研究证据表明 ASD 的发生有遗传倾向。尽管如此, 临床、神经解剖学、神经生理学和流行病学调查研究表明基因的外显性和表达在某些情况下受到强烈的影响, 如出生前和出生后早期的周围环境^[11]。

表1-1 ASD诊断标准

Table1-1 ASD Diagnostic Criteria

行为表现类型	症状特征
社会缺陷 当前或过去表现出下列几项	1.永久性的社会交流与交往缺陷，包括：社会情感互动和社会沟通缺陷、缺乏感情的分享、不能发起或响应社会互动 2.社会交往的非语言沟通行为存在缺陷，包括：言语的拙劣整合和非言语沟通；异常的眼神接触、身体语言或理解和使用手势的缺陷；完全缺乏面部表情 3.发展、维持和理解关系存在缺陷，包括：难以调整行为去适应不同的社会环境，对同伴缺乏兴趣，共享想象性游戏或交友困难
受限制、重复性模式的行为、兴趣或活动 当前或过去表现出以下至少两项	1.刻板或重复运动的动作、讲话，或使用物品（例如：简单运动刻板、排列玩具或仿说、翻转物品、特异的话语） 2.僵化固守常规惯例，坚持千篇一律，或仪式化的模式或语言非语言行为（例如：过渡困难，对微小的变化极端痛苦难忍，僵化的思维模式、问候礼仪，坚持走同样的路线） 3.高度限制、依恋的兴趣，且异常强烈或集中（例如，强烈的依恋，或着迷于不寻常之物，过度受限或固执的兴趣） 4.对感官输入有异常的反应性或对环境中的感官因素有异常的兴趣（例如：对特定的声音或质地有不良反应，对疼痛/温度的明显冷漠，过度嗅闻或触摸物体）
症状发展时期	症状必须存在于发育早期（但缺陷可能并没有充分表现出来直到社会沟通的需要超出其受限制的能力时，或可能被后来在生活中掌握的技巧所掩盖）
身体机能	症状导致当前的身体机能在社交、职业或其他重要领域临床上严重受损
智力障碍	这些失调都不能用智力发展障碍或全面性发展迟缓更好地解释。智力残疾和ASD经常共同发生，对社会沟通的预期应低于一般发展水平

注：本表格依据《美国精神障碍诊断统计手册》（DSM-5）孤独症诊断标准编制

Note: Followed by 《the Fifth Edition of the Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders》 (DSM-5) of ASD Diagnostic Criteria.

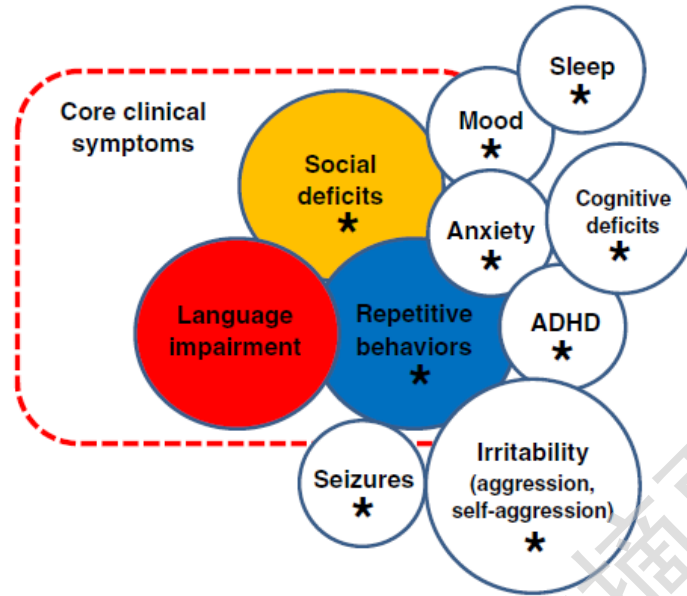


图1-1 ASD的核心临床特征和相关症状

注：核心临床症状在图中标有颜色，圆的大小没有特别的含义，标记有星号的区域（症状群）表示此症状能在斑马鱼建立模型。ADHD-注意力分散及过度活跃。引自Stewart, A M et al.^[13]。

Fig.1-1 Key clinical features of autism spectrum disorder (ASD) and related syndromes

Note: Core ASD symptoms in this diagram are marked with color, circle sizes does not represent a particular aspect of notice. Asterisks denote domains (clusters of symptoms) that can be modeled in zebrafish. ADHD—attention deficit and hyperactivity. Based on Stewart, A M et al.^[13].

1.1.2 自闭症的病因学研究

遗传因素：已有文献表明 ASD 是一种涉及到多基因位点的遗传疾病，现有研究发现常见的 ASD 易感基因包括：神经连接蛋白 1 (neurexins 1, *nlgn1*)、甲基化 CpG 结合蛋白 2 (methyl CpG binding protein 2, *mecp2*)、脆性 X 心理迟缓 1 (fragile X mental retardation 1, *fmr1*)、结节性硬化 1/2 (tuberous sclerosis 1/2, *tsc1/2*)、特定肌细胞增强子 2c (myocyte-specific enhancer factor 2c, *mef2c*)、磷酸化酶和张力蛋白同系物 B (phosphatase and tensin homolog B, *ptenb*)、精神分

裂干扰 1 (disrupted in schizophrenia 1, *disc1*) 等^[6, 14-16]。*Mecp2* 是一个在 X 染色体上发现的基因，编码一种叫做甲基 CpG 结合蛋白 2 的甲基连接蛋白，瑞氏综合征的发生与这个基因的突变相关^[17]，这是一种渐进式的神经系统发育障碍和女性智力低下疾病^[4]。*Disc1* 的突变被认为和多种表型相关，例如精神分裂症患者大脑结构的异常、临床抑郁症、狂躁症和 ASD 等^[18]。2008 年，一项针对有 ASD 或阿斯伯格综合症病史的 97 个芬兰家庭的基因筛查发现，*disc1* 基因的 DNA 序列在 ASD 患者中有重复。在斑马鱼中有一个和人类 16p11.2 染色体区域同源的区域，含有很多对大脑发育重要的基因，其中就包括 *kctd13*，它控制斑马鱼的神经元发育和大脑大小，在一些人类病例中被认为是 ASD 的重要影响因素^[13]。脆性 X 综合征是一种最常见的由 *fmr1* 基因引起的 X 染色体连锁遗传性智障，脆性 X 综合征是由 fragile X 智力低下蛋白 (FMRP) 响应 *fmr1* 基因沉默降低表达引起的，常见的特征有学习和认知能力缺陷，比如工作记忆和视觉空间辨认损伤、活动能力下降、注意力分散、焦虑、胆怯、单一重复性行为等，还能引起卵巢功能早衰、ASD、帕金森综合症、发育迟缓和其他认知缺陷^[19]。人体染色体 15q11-13 区段是 ASD 患者中最常见的一种遗传异常，是所有精神疾病中遗传倾向最明显的区段之一^[20]，这个区段重复的小鼠表现出社会障碍、超声波发声异常、焦虑等 ASD 相关异常行为，说明遗传因素在该病的发展中起着重要作用^[14]。

环境因素：有人认为暴露于环境化学物可能加剧 ASD 的遗传易感性，或损害 ASD 患者的解毒能力^[21]。有报道发现，一些 ASD 患者体内的环境污染物水平异常，许多 ASD 患者对某些化学物质没有耐受力^[22]。铅 (Lead, Pb) 和多环芳烃 (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, PAHs) 的环境污染可能和近年来 ASD 发病率的升高有关系^[23, 24]，产前暴露于环境污染物，如：Benzo(a)pyrene (Bap)，已经表明损害大脑发育；母亲产前 PAHs 的暴露能够引起儿童的行为异常^[25]。产前 PAHs 暴露对儿童的两个负面影响是损伤认知发育和学习能力^[26]。产前暴露在污染的空气中，尤其是重金属和微粒物质，显著增加了后代患

ASD 的风险^[27]。有流行病学调查发现居住在高速公路附近的家庭出生的孩子患 ASD 的概率比较高^[12, 22, 25]，母亲在整个孕期吸烟和子代 ASD 发病率增加有关联，母亲在怀孕期暴露在 PAHs 中还与婴儿的皮质功能损伤和认识发育延迟有关^[25, 27]。ASD 的发生与母亲怀孕期及子代生命早期（1 岁前）暴露于交通排放的尾气中（如 NO₂、PM_{2.5} 和 PM₁₀）有关^[28]。

分子机制：有一种假说认为，感觉刺激高敏感性导致 ASD 个体重复性行为增加，感觉刺激的敏感性和激素水平相关^[29]。皮质醇在调节情绪方面有重要作用，压力状态下，皮质醇一般会维持血压稳定和控制过度发炎^[29]；有报道发现，ASD 患者体内皮质醇的水平有变化^[30]。有证据表明，在 ASD 人群中以更水平的皮质醇应对压力以及相关的感觉敏感性，初步研究评估重复性行为的反应反映了潜在的病理生理学与皮质醇的调节^[29]。五羟色胺（5-hydroxytryptamine, 5-HT）在产前和产后对大脑的发育很重要，对刺激脑细胞发育有重要作用，在个体发育早期 5-HT 调节神经的生长^[31]，5-HT 还在认知和情感变化过程中起重要作用^[32]。有报道表明，皮质醇反馈调节青少年期的 BTBR T⁺tf/J（简称 BTBR）小鼠（是一种近交系小鼠，具有 ASD 的核心症状）5-HT 的表达^[33]。

还有一种假说认为，ASD 基因和蛋白被活性依赖的调节突触功能的通路调节和控制，许多基因突变导致 ASD 的兴奋性或抑制性神经递质发生相关改变，活性神经元调节许多与 ASD 相关蛋白的功能、传递和表达从而引起 ASD。神经元活动诱导突触分子的翻译后修饰，促进树突的局部蛋白合成和激活基因转录表达，从而调节突触的功能。因此，活性依赖的控制突触发育和功能信号网络可能是 ASD 发生的重要分子基础^[4]。

ATPase 是存在于细胞内的一种蛋白酶，对能量转换、物质运送和信息传递等具有重要作用。ATPase 水解 ATP 以提供细胞活动的能量，ATPase 活力是细胞能量代谢及功能运转的重要指标。Ca²⁺-ATPase 和 Na⁺/K⁺-ATPase 是 ATPase 家族中的两个重要成员，Ca²⁺-ATPase 称钙泵系统，主要功能是将胞浆中的 Ca²⁺

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.